

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b>  <b>C07K</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/32891</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 12. September 1997 (12.09.97)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE97/00458  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 7. März 1997 (07.03.97)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 08 813.5      7. März 1996 (07.03.96)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH [DE/DE]; Rischerstrasse 12, D-69123 Heidelberg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> ROSE-JOHN, Stefan [DE/DE]; I. Medizinische Klinik - Abt. Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Obere Zahlbacherstrasse 63, D-55101 Mainz (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger-Strasse 246, D-81825 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> CONJUGATE FOR MODIFYING INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS  <b>(54) Bezeichnung:</b> KONJUGAT ZUR BEEINFLUSSUNG VON WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PROTEINEN  <b>(57) Abstract</b>  The present invention concerns a conjugate comprising two polypeptides with a mutual affinity and connected via a linker. It also concerns the use of such a conjugate to modify interactions between proteins.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Konjugats zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen.		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

## "Konjugat zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen"

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, daß sich zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen eignet, eine ein solches Konjugat kodierende DNA und die Verwendung des Konjugats.

Viele Vorgänge in einem Organismus beruhen auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen. Beispiele solcher Wechselwirkungen finden sich bei Rezeptoren und den an sie bindenden Liganden. Oftmals sind allerdings die Wechselwirkungen zwischen Proteinen gestört. Dies kann daran liegen, daß einzelne an den Wechselwirkungen beteiligte Proteine modifiziert sind, wodurch ihre Affinität zu anderen, ebenfalls beteiligten Proteinen verändert ist. Auch können einzelne an den Wechselwirkungen beteiligte Proteine fehlen. Dies findet man z.B. bei Zellen, die nicht auf Interleukin-6 (IL-6) reagieren. Solche Zellen weisen einen unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor auf, d. h. dieser Rezeptor umfaßt lediglich die intrazelluläre, Signal-auslösende Untereinheit gp130, nicht aber die extrazelluläre, IL-6 bindende Untereinheit (IL-6R).

Viele Versuche werden unternommen, gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beheben. Beispielsweise wird dies bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor durch Verabreichung von IL-6 (50 ng/ml) und löslichem IL-6R (sIL-6R) (1280 ng/ml) versucht. Die Bereitstellung von sIL-6R bedingt jedoch einen großen Kosten- und Zeitaufwand, da sIL-6R nur biologisch aktiv ist, wenn es aus eukaryotischen Zellen stammt, und die Erträge aus solchen im Bereich von 1-6 mg sIL-6R/l liegen. Die genannte Verabreichung stellt somit kein geeignetes Mittel dar, dauerhaft die gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor zu beheben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem gestörte Wechselwirkungen zwischen Proteinen, insbesondere bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor, behoben werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck "eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide" betrifft Polypeptide jeglicher Art, Herkunft und Länge, die eine Affinität zueinander aufweisen. Zwei solcher Polypeptide liegen in einem erfindungsgemäßen Konjugat vor. Eines dieser Polypeptide kann ein Rezeptor und das andere ein an den Rezeptor bindender Ligand sein. Der Rezeptor kann in Form seiner Untereinheit bzw. des funktionellen Teils davon vorliegen, die den Liganden binden. Ebenso kann der Ligand in Form seiner Untereinheit bzw. des funktionellen Teils davon vorliegen, die den Rezeptor binden. Vorzugsweise ist der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor, insbesondere ein Rezeptor für Lymphokine, Monokine, Interferone, "colony stimulating factors" oder Interleukine. Besonders bevorzugt ist der Rezeptor ein Interleukin-6-Rezeptor oder ein CNTF-Rezeptor. Entsprechendes gilt für den Liganden. Dieser ist vorzugsweise ein Zytokin, insbesondere ein Lymphokin, Monokin, Interferon, "colony stimulating factor" oder Interleukin. Besonders bevorzugt ist der Ligand ein Mitglied der Interleukin-6-Familie, insbesondere IL-6, IL-11, CNTF, OSM, LIF oder CT-1. Der Rezeptor und der Ligand können Wildtyp-Sequenzen oder hiervon durch ein oder mehrere Nukleotide unterschiedliche Sequenzen umfassen. Dadurch können der Rezeptor und der Ligand verbesserte und/oder neue Eigenschaften aufweisen. Verbesserte Eigenschaften können z.B. darin liegen, daß die Bindung zwischen dem Rezeptor und dem Ligand verbessert ist. Neue Eigenschaften können z.B. darin liegen, daß der Ligand ein verändertes Verhalten zu Proteinen zeigt, mit denen er nach Bindung an den Rezeptor reagiert. Beispielsweise kann IL-6 dahingehend verändert sein, daß es eine stärkere Bindung an den IL-6-Rezeptor hat, das Protein gp130 aber nicht mehr aktivieren kann. In einem solchen Fall umfaßt IL-6 vorzugsweise die Sequenz von Fig. 3 oder Fragmente davon. Vorstehende Ausführungen hinsichtlich einer Verände-

rung der Wildtyp-Sequenz eines Rezeptors bzw. eines Liganden gelten entsprechend für deren Untereinheiten und funktionellen Teile davon, die zu einer gegenseitigen Bindung beitragen.

Der Ausdruck "Linker" betrifft Linker jeglicher Art, die sich zur Verbindung von Polypeptiden eignen. Beispiele solcher Linker sind bifunktionelle, chemische Cross-Linker, z.B. DPDPB. Ferner kann der Linker eine durch die beiden Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke sein. Desweiteren kann der Linker ein Polypeptid sein.

In bevorzugter Ausführungsform ist ein vorstehendes Konjugat ein Fusionspolypeptid. In diesem können die zwei, eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide miteinander fusioniert sein und der Linker einer durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke darstellen. Vorzugsweise ist der Linker ein Polypeptid, das die zwei anderen Polypeptide miteinander verbindet. Beispiele letzteren Fusionspolypeptids sind in den Figuren 1 und 2 angegeben. Diese Fusionspolypeptide umfassen ein humanes sIL-6R-Polypeptid, d.h. die extrazelluläre Untereinheit eines Interleukin-6-Rezeptors, und ein humanes IL-6-Polypeptid, wobei die Polypeptide über unterschiedliche Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind. Diese Fusionspolypeptide werden mit H-IL-6 bezeichnet. Eine Variation von H-IL-6, die von dem sIL-6R-Polypeptid nur die Aminosäuren Pro 114 bis Ala 323 enthält, wird ebenfalls bereitgestellt. Ferner wird eine Variation von H-IL-6 bereitgestellt, welche die Aminosäuren 113 bis 323 des sIL-6R-Polypeptids und die Aminosäuren 29 bis 212 des IL-6-Polypeptids umfaßt. Desweiteren wird ein Fusionspolypeptid H-IL-6 bereitgestellt, dessen IL-6-Polypeptid die Sequenz von Fig. 3 umfaßt. Das sIL-6R-Polypeptid dieses Fusionspolypeptids umfaßt eine vollständige Sequenz bzw. die Sequenz zwischen den Aminosäuren 113 (114) bis 323 eines sIL-6R-Polypeptids. Darüberhinaus wird ein Fusionspolypeptid bereitgestellt, das die extrazelluläre Untereinheit eines humanen CNTF-Rezeptors und humanes CNTF umfaßt, wobei beide Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für ein vorstehendes Fusionspolypeptid kodierende DNA. Vorzugsweise kodiert die DNA für ein Fusionspolypeptid, bei dem die zwei, eine Affinität zueinander aufweisenden Polypeptide über einen Polypeptid-Linker miteinander verbunden sind. Ein Beispiel letzterer DNA ist in Fig. 1 angegeben. Diese DNA wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) als CDM8-H-IL-6 unter DSM 10549 am 27. 2. 1996 hinterlegt.

Eine erfindungsgemäße DNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100, Ycpad1 und Vektoren für *Pichia pastoris* zu nennen, wobei letztere bevorzugt sind, während für die Expression in tierischen Zellen, die in einem Organismus oder außerhalb eines solchen vorliegen können, z.B. pKCR, pEFBOS, pCEV4 und pCDM8 angegeben sind, wobei letzterer bevorzugt ist. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A. Der Fachmann wird berücksichtigen, daß für die Expression einer erfindungsgemäßen, sIL-6R-Sequenzen enthaltenden, DNA Vektoren angeraten sind, die eine Expression in eukaryotischen Zellen ermöglichen.

Ferner kennt der Fachmann geeignete Zellen, um eine erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E.coli*-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*, wobei letzterer bevorzugt ist, die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, Vero, HeLa und COS, wobei letztere bevorzugt sind, sowie die Insektenzellen sf9.

Desweiteren weiß der Fachmann, in welcher Weise eine erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Auch kennt er Bedingungen, Zellen zu transformieren bzw. transfizieren und diese dann zu kultivieren. Darüberhinaus sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA

exprimierte Fusionspolypeptid zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Fusionspolypeptid gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden Fusionspolypeptid zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen Fusionspolypeptid erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beeinflussen. Dies kann durch die Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate wie auch durch den Einsatz erfindungsgemäßer DNA in einer Gentherapie erfolgen. Insbesondere können die gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor behoben werden. Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß sie kostengünstig eingesetzt werden kann. Dies zeigt sich insbesondere in der Verabreichung erfindungsgemäßer Konjugate zur Beeinflussung der gestörten Wechselwirkungen bei einem unvollständigen Interleukin-6-Rezeptor.

Ferner eignet sich die vorliegende Erfindung zur ex vivo Expansion von Stammzellen, insbesondere humanen Stammzellen. Besonders bemerkenswert ist es dabei, daß mit einem erfindungsgemäßen Konjugat H-IL-6 mehr Stammzell-Kolonien im Soft-Agar erhalten werden, als dies mit den einzelnen Komponenten IL-6 und sIL-6R möglich ist. Die vorliegende Erfindung stellt somit auch einen wichtigen Beitrag dar, gezielt in die Bildung von Blutzellen einzugreifen.

Desweiteren stellt die vorliegende Erfindung mit einem Fusionspolypeptid H-IL-6, das als IL-6-Polypeptid die Sequenz von Fig. 3 umfaßt, ein Mittel bereit, das sich

als IL-6-Rezeptor-Antagonist eignet. Ein solches Mittel ist von hohem therapeutischen Wert.

Die Durchführung der vorliegenden Erfindung kann durch die erfindungsgemäßen Antikörper überwacht werden.

#### **Kurze Beschreibung der Zeichnung**

- Fig. 1 zeigt die Aminosäure (DNA)-sequenz eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6. Sequenzen für das Restriktionsenzym Sall (GTCGAC), das Signalpeptid (MLAVGCALLAALLAAPGAA) und den Linker (RGGGGSGGGGSGGGGSVE) sind angegeben. Der Linker verbindet den COOH-Terminus von humanem sIL-6R mit dem NH<sub>2</sub>-Terminus von humanem IL-6.
- Fig. 2 zeigt die Aminosäure (DNA)-sequenz eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6. Sequenzen für das Restriktionsenzym Sall (GTCGAC), das Signalpeptid (MLAVGCALLAALLAAPGAA) und den Linker (RGGGGSGGGGSGGGGSVE) sind angegeben. Der Linker verbindet den COOH-Terminus von humanem sIL-6R mit dem NH<sub>2</sub>-Terminus von humanem IL-6.
- Fig. 3 zeigt die Aminosäuresequenz des in einem erfindungsgemäßen Fusionspolypeptid H-IL-6 vorliegenden IL-6-Polypeptids.
- Fig. 4 zeigt die Expansions- und Koloniebildungsfähigkeit eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids H-IL-6.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.



**Beispiel 1: Herstellung einer erfindungsgemäßen DNA**

Es wurde die DNA von Fig. 1 hergestellt. Dazu wurde humane IL-6R cDNA (Schooltink et al., Biochem. J. (1991) 277, 659-664) verwendet. Diese cDNA wurde in das Expressionsplasmid pCDM8 über die Restriktionsstelle Xho I einkloniert (Müllberg et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 473-480). Mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde unter Verwendung der Primer (1) (pCDM8 5' Primer: 5' TAATACGACTCACTATAGGG3') und Primer (2) (sIL-6R 3' Primer: 5'CCGCTCGAGCTGGAGGACTCCTGGA 3') bei Standardbedingungen ein sIL-6R Fragment generiert, das nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen Hind III und Xho I in das geöffnete Plasmid pCDM8 einkloniert wurde. Es entstand das Plasmid pCDM8-sIL-6R. Anschließend wurde eine zweite PCR Reaktion mit IL-6 cDNA, die ebenfalls in das Expressionsplasmid pCDM8 unter Verwendung von Xho I einkloniert worden war, durchgeführt. Es wurden die Primer (3) (IL-6-5' Primer: 5' CGGCTCGAGCCAGTACCCCCAGGAGAA3') und Primer (4) (pCDM8 3' Primer: 5'CCACAGAAGTAAGGTTCTT3') verwendet. Das PCR Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Xho I und Not I geschnitten und in das Plasmid pCDM8-sIL-6R einkloniert. Es entstand das Plasmid pCDM8-sIL-6R-IL-6. Anschließend wurde ein synthetischer Linker hergestellt, der aus zwei Oligonukleotiden bestand: Primer (5) (5'TCGAGGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTTG3') und Primer (6) (5'TCGACAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCC3'. Die Oligonukleotide (5) und (6) wurden nach Standardmethoden zu einem Doppelstrang zusammengefügt und anschließend in das mit dem Restriktionsenzym Xho I verdaute Plasmid pCDM8-sIL-6R-IL-6 einkloniert. Es entstand das Plasmid pCDM8-H-IL-6.

**Beispiel 2: Herstellung einer erfindungsgemäßen DNA**

Es wurde die DNA von Fig. 2 hergestellt. Hierzu wurde vorgegangen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Als Primer (5) und (6) wurden jedoch verwendet: Primer (5) (5'TCGAGGAGGTGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCTTG3') und Primer (6)

(5'TCGACAGAACCTCCACCTCCAGAACCTCCACCTCC3'. Es wurde das Plasmid pCDM8-H-IL-6-(2) erhalten.

### **Beispiel 3: Expression eines erfindungsgemäßen Fusionspolypeptids**

5

10

15

COS-7-Zellen wurden mit pCDM8-H-IL-6 von Beispiel 1 bzw. pCDM8-H-IL-6(2) von Beispiel 2 mit Hilfe der Elektroporation transfiziert. Es wurden  $10^7$  COS-7 Zellen mit  $20\mu\text{g}$  Plasmid mit Hilfe eines Gene-Pulsers (Bio-Rad) bei  $960\mu\text{F}$  und 230 V elektroporiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen metabolisch mit [ $^{35}\text{S}$ ]-Cystein/Methionin 4 h radioaktiv markiert und 2 h mit nicht radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert. Der Überstand aus Zellysat und Zellüberstand wurde nach Standardmethoden (Müllberg et al., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 473-480) mit einem anti-IL-6 Antikörper immunpräzipitiert und nach SDS-Gelelektrophorese durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Transfizierte COS-7 Zellen sezernierten ein 70-75 kDa Protein, das von einem anti-IL-6 Antikörper erkannt und nicht von untransfizierten Zellen gebildet wurde.

20

Überstände von transfizierten COS-7 Zellen wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem anti-IL-6 Antikörper detektiert. Wiederum exprimierten transfizierte COS-7 Zellen ein 70-75 kDa Protein, das von einem anti-IL-6 Antikörper erkannt wurde.

25

Überstände von transfizierten COS-7 Zellen wurden mit Hilfe eines kommerziellen ELISA auf IL-6 (CLB, Amsterdam) und sIL-6R (Seromed, Gießen) untersucht. Mit beiden ELISAs wurde H-IL-6 detektiert. Die Konzentration von H-IL-6 im Zellüberstand betrug etwa  $1\mu\text{g/ml}$ .

30

### **Beispiel 4: Stimulation der Haptoglobin-Expression durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid**

Es wurden die humanen Hepatomazelllinien HepG2, HepG2-IL-6 und HepG2-PDI verwendet.

HepG2 Zellen (ATCC HB 8065) werden durch IL-6, nicht aber durch sIL-6R stimuliert, Haptoglobin zu exprimieren.

5 HepG2-IL-6 Zellen wurden durch stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem humanen IL-6-Expressionsplasmid erhalten. Diese Zellen regulieren aufgrund der IL-6 Expression endogenes IL-6R herunter und exprimieren somit kein IL-6R. HepG2-IL-6 Zellen werden nicht durch IL-6, aber durch sIL-6R stimuliert, Haptoglobin zu exprimieren.

10 HepG2-PDI Zellen wurden durch stabile Transfektion von HepG2 Zellen mit einem humanen IL-6-Expressionsplasmid erhalten. Hierzu wies das Expressionsplasmid eine IL-6 cDNA auf, durch die das exprimierte IL-6 Protein ein COOH-terminales Retentionssignal für das Endoplasmatische Retikulum (ER) enthielt. Daraus resultierte, daß diese Zellen nicht durch das exprimierte IL-6 sondern  
15 auch IL-6R im ER zurückhielten. Im Gegensatz zu HepG2-IL-6 Zellen sezernieren aber HepG2-PDI Zellen kein IL-6 und können nur durch die Kombination von IL-6 und sIL-6R stimuliert werden, Haptoglobin zu exprimieren.

20 Die vorstehenden Hepatomazelllinien wurden nach Standardbedingungen in 96er Zellkulturplatten kultiviert (Rose-John et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 22084-22091). Die Zellen wurden mit IL-6, sIL-6R, IL-6 + sIL-6R bzw. Zellüberständen aus mit pCDM8-H-IL-6, pCDM8-H-IL-6(2) bzw. pCDM8 transfizierten COS-7 Zellen von Beispiel 3 18 h stimuliert. Der Zellüberstand wurde geerntet und die Haptoglobinkonzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt (vgl. Tabelle I).

25

30

Tabelle I

## Stimulation der Haptoglobin-Expression

5		IL-6	sIL-6R	IL-6 + sIL-6R	H-IL-6	Kontrolle
	HepG2	+	-	++	+++	-
	HepG2-IL-6	-	++	++	+++	-
	HepG2-PDI	-	-	++	+++	-

10 Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid, H-IL-6, in der Lage ist, die Expression von Haptoglobin in Zellen zu stimulieren, d.h. die Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu beeinflussen.

15 **Beispiel 5: Expansion und Koloniebildung von humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid**

Aus humanem Knochenmark bzw. aus Blut von Patienten, deren Stammzellen durch Injektion von G-CSF mobilisiert worden waren, wurden Zellen isoliert, die den Oberflächenmarker CD34 exprimieren. 6000 dieser Zellen wurden in 3ml  
 20 Medium in Zellkulturgefäße platiert. Nach zwei Wochen zeigte es sich, daß eine Inkubation der Zellen mit den Zytokinen SCF, IL-3 und H-IL-6 (erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid), wie auch mit SCF, IL-3 und IL-6 eine starke Proliferation verursachte. Von den entstandenen Zellen wurden 1000 Zellen in neue Zellkulturgefäße platiert. Nach zwei Wochen in einem standartisierten Kolonie-  
 25 Induktions-Versuch waren die mit SCF, IL-3 und H-IL-6 behandelten Zellen in der Lage, etwa dreimal mehr Kolonien zu bilden als mit SCF, IL-3 und IL-6 behandelte Zellen.

30 Dieses Ergebnis zeigt, daß Zellen, die durch ein erfindungsgemäßes Fusionspolypeptid H-IL-6 stimuliert wurden, ein höheres koloniebildendes Potential besitzen als durch IL-6 stimulierte Zellen (vgl. Fig. 4).

**Patentansprüche**

1. Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind.
- 5 2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das eine Polypeptid ein Rezeptor und das andere ein den Rezeptor bindender Ligand ist.
3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor in Form seiner den Liganden bindenden Untereinheit vorliegt.
- 10 4. Konjugat nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand in Form seiner den Rezeptor bindenden Untereinheit vorliegt.
5. Konjugat nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor und der Ligand ein Zytokin ist.
- 15 6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein IL-6 Rezeptor und das Zytokin ein IL-6 ist.
7. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein CNTF-Rezeptor und das Zytokin ein CNTF ist.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke ist.
- 25 9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein bifunktioneller, chemischer Cross-Linker ist.
10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat ein Fusionspolypeptid ist.
- 30

11. Konjugat nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein Polypeptid ist, das die zwei anderen Polypeptide miteinander verbindet.
12. DNA, kodierend für das Konjugat nach Anspruch 10 oder 11.
13. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 12.
14. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 13.
15. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 - 11 und der DNA nach Anspruch 12 zur Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

Fig. 1

1	GTG	G	A	C	A	T	G	G	A	G	T	G	G	C	A	G	A	G	C	T	G	63
1																					10	
64	GCC	CTG	CTG	GCC	GGC	CCG	GGA	GCG	GCG	CTG	GCC	CCA	AGG	CGC	TGC	CCT	CGC	CAG	GAG	GTG	123	
11	A	L	L	A	A	P	G	A	A	L	A	P	R	R	C	P	A	Q	E	V	30	
124	GCA	AGA	GGC	GTG	CTG	ACC	AGT	CTG	CCA	GGA	GAC	AGC	GTG	ACT	CTG	ACC	TGC	CCG	GGG	GTA	183	
31	A	R	G	V	L	T	S	L	P	G	D	S	V	T	L	T	C	P	G	V	50	
184	GAG	CCG	GAA	GAC	AAT	GCC	ACT	GTT	CAC	TGG	GTG	CTC	AGG	AAG	CCG	GCT	GCA	GGC	TCC	CAC	243	
51	E	P	E	D	N	A	T	V	H	W	V	L	R	K	P	A	A	G	S	H	70	
244	CCC	AGC	AGA	TGG	GCT	GGC	ATG	GGA	AGG	AGG	CTG	CTG	CTG	AGG	TGC	GTG	CAG	CTC	CAC	GAC	303	
71	P	S	R	W	A	G	M	G	R	A	R	L	L	L	R	S	V	Q	L	H	D	90
304	TCT	GGA	AAC	TAT	TCA	TGC	TAC	CGG	GCC	GGC	CGC	CCA	GCT	GGG	ACT	GTG	CAC	TTG	CTG	GTG	363	
91	S	G	N	Y	S	C	Y	R	A	G	R	P	A	G	T	V	H	L	L	V	110	
364	GAT	GTT	CCC	CCC	GAG	GAG	CCC	CAG	CTC	TCC	TGC	TTC	CGG	AAG	AGC	CCC	CTC	AGC	AAT	GTT	423	
111	D	V	P	P	E	E	P	Q	L	S	C	F	R	K	S	P	L	S	N	V	130	
424	GTT	TGT	GAG	TGG	GGT	CCT	CGG	AGC	ACC	CCA	TCC	CTG	ACG	ACA	AAG	GCT	GTG	CTC	TTG	GTG	483	
131	V	C	E	W	G	P	R	S	T	P	S	L	T	T	K	A	V	L	L	V	150	
484	AGG	AAG	TTT	CAG	AAC	AGT	CCG	GCC	GAA	GAC	TTC	CAG	GAG	CCG	TGC	CAG	TAT	TCC	CAG	GAG	543	
151	R	K	F	Q	N	S	P	A	E	D	F	Q	E	P	C	Q	Y	S	Q	E	170	
544	TCC	CAG	AAG	TTC	TCC	TGC	CAG	TTA	GCA	GTC	CCG	GAG	GGA	GAC	AGC	TCT	TTC	TAC	ATA	GTG	603	
171	S	Q	K	F	S	C	Q	L	A	V	P	E	G	D	S	S	F	Y	I	V	190	
604	TCC	ATG	TGC	GTC	GCC	AGT	AGT	GTC	GGG	AGC	AAG	TTC	AGC	AAA	ACT	CAA	ACC	TTT	CAG	GGT	663	
191	S	M	C	V	A	S	S	V	G	S	K	F	S	K	T	Q	T	F	Q	G	210	
664	TGT	GGA	ATC	TTG	CAG	CCT	GAT	CCG	CCT	GCC	AAC	ATC	ACA	GTC	ACT	GCC	GTG	GCC	AGA	AAC	723	
211	C	G	I	L	Q	P	D	P	P	A	N	I	T	V	T	A	V	A	R	N	230	
724	CCC	CGC	TGG	CTC	AGT	GTC	ACC	TGG	CAA	GAC	CCC	CAC	TCC	TGG	AAC	TCA	TCT	TTC	TAC	AGA	783	
231	P	R	W	L	S	V	T	W	Q	D	P	H	S	W	N	S	S	F	Y	R	250	
784	CTA	CGG	TTT	GAG	CTC	AGA	TAT	CGG	GCT	GAA	CGG	TCA	AAG	ACA	TTT	ACA	ACA	TGG	ATG	GTC	843	
251	L	R	F	E	L	R	Y	R	A	E	R	S	K	T	F	T	T	W	M	V	270	

Fortsetzung Fig. 1

844 AAG GAC CTC CAG CAT CAC TGT GTC ATC CAC GAC GCC TGG AGC GGC CTG AGG CAC GTG GTG 903  
 271 K D L Q H C V I H D A W S G L R H V V 290  
 904 CAG CTT CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC GAG TGG AGC CCG GAG GCC 963  
 291 Q L R A Q E E F G Q G E W S E W S P E A 310  
 964 ATG GGC ACG CCT TGG ACA GAA TCC AGG AGT CCT CCA GCT CGA GGA GGT GGA GGT TCT TCT GGA 1023  
 311 M G T P W T E S R S P P A R G G G G G S G 330  
 1024 GGT GGA GGT TCT GGA GGT GGA GGT TCT GTC GAG CCA GTA CCC CCA GGA GAA GAT TCC AAA 1083  
 331 G G G S G G G S V E P V P P P G E D S K 350  
 1084 GAT GTA GCC GCC CCA CAC AGA CAG CCA CTC ACC TCT TCA GAA CGA ATT GAC AAA CAA ATT 1143  
 351 D V A A P H R Q P L T S S E R I D K Q I 370  
 1144 CCG TAC ATC CTC GAC GGC ATC TCA GCC CTG AGA AAG GAG ACA TGT AAC AAG AGT AAC ATG 1203  
 371 R Y I L D G I S A L R K E T C N K S N M 390  
 1204 TGT GAA AGC AGC AAA GAG GCA CTG GCA GAA AAC CTG AAC CTT CCA AAG ATG GCT GAA 1263  
 391 C E S S K E A L A E N N L N L P K M A E 410  
 1264 AAA GAT GGA TGC TTC CAA TCT GGA TTC GGA TTT GAG GAG ACT TGC CTG GTG AAA ATC ATC ACT 1323  
 411 K D G C F Q S G F N E E T C L V K I I T 430  
 1324 GGT CTT TTG GAG TTT GAG GTA TAC CTA GAG TAC CTC CAG AAC AGA TTT GAG AGT AGT GAG 1383  
 431 G L L E F E V Y L E Y L Q N R F E S S E 450  
 1384 GAA CAA GCC AGA GCT GTG CAG ATG AGT ACA AAA GTC CTG ATC CAG TTC CTG CAG AAA AAG 1443  
 451 E Q A R A V Q M S T K V L I Q F L Q K K 470  
 1444 GCA AAG AAT CTA GAT GCA ATA ACC CCT GAC CCA ACC ACA AAT GCC AGC CTG CTG ACG 1503  
 471 A K N L D A I T T P D P T T N A S L L T 490  
 1504 AAG CTG CAG GCA CAG AAC CAG TGG CTG CAG GAC ATG ACA ACT CAT CTC ATT CTG CGC AGC 1563  
 491 K L Q A Q N Q W L Q Q D M T T H L I L R S 510  
 1564 TTT AAG GAG TTC CTG CAG TCC AGC CTG AGG GCT CTT CGG CAA ATG TAG CATGGCCACCGTCGAC 1627  
 511 F K E F L Q S S L R A L R Q M 525



Fig. 2

1	GTCTGACGC	ATG	GAG	TGG	TAG	CCGAGGAGGAAGC	ATG	CTG	GCC	GTC	GGC	TGC	GCG	CTG	CTG	GCT	63
1								M	L	A	V	G	C	A	L	L	10
64	GCC	CTG	CTG	GCC	GCG	CCG	GGA	GCG	GCG	CTG	GCC	CCA	AGG	CGC	TGC	CCT	123
11	A	L	L	A	A	P	G	A	A	L	A	P	R	R	C	P	30
124	GCA	AGA	GGC	GTG	CTG	ACC	AGT	CTG	CCA	GGA	GAC	AGC	GTG	ACT	CTG	ACC	183
31	A	R	G	V	L	T	S	L	P	G	D	S	V	T	L	T	50
184	GAG	CCG	GAA	GAC	AAT	GCC	ACT	GTT	CAC	TGG	GTG	CTC	AGG	AAG	CCG	GCT	243
51	E	P	E	D	N	A	T	V	H	W	V	L	R	K	P	A	70
244	CCC	AGC	AGA	TGG	GCT	GGC	ATG	GGA	AGG	AGG	CTG	CTG	CTG	CTG	TCG	GTG	303
71	P	S	R	W	A	G	M	G	R	G	R	L	L	L	S	V	90
304	TCT	GGA	AAC	TAT	TCA	TGC	TAC	TGC	CGG	GCC	GGC	CGC	CCA	GCT	GGG	ACT	363
91	S	G	N	Y	S	C	Y	R	A	G	R	P	A	G	T	V	110
364	GAT	GTT	CCC	GAG	GAG	CCC	CAG	CTC	TCC	TGC	TTC	TGC	CGG	AAG	AGC	CCC	423
111	D	V	P	P	E	P	Q	L	S	C	F	R	K	S	P	L	130
424	GTT	TGT	GAG	TGG	GGT	CCT	CGG	AGC	ACC	CCA	TCC	CTG	ACG	ACA	AAG	GCT	483
131	V	C	E	W	G	P	P	R	S	T	P	S	L	T	T	K	150
484	AGG	AAG	TTT	CAG	AAC	AGT	CCG	GCC	GAA	GAC	TTC	CAG	GAG	CCG	TGC	CAG	543
151	R	K	F	Q	N	S	P	A	E	D	F	Q	E	P	C	Q	170
544	TCC	CAG	AAG	TTT	TCC	TGC	CAG	TTA	GCA	GTC	CCG	GAG	GGA	GAC	AGC	TCT	603
171	S	Q	K	F	S	C	Q	L	A	V	P	E	G	D	S	S	190
604	TCC	ATG	TGC	GTC	GCC	AGT	AGT	GTC	GGG	AGC	AAG	TTT	AGC	AAA	ACT	CAA	663
191	S	M	C	V	A	S	S	S	V	G	S	K	F	S	K	T	210
664	TGT	GGA	ATC	TTG	CAG	CCT	GAT	CCG	CCG	GAT	CCG	ATC	ACA	GTC	ACT	GCC	723
211	C	G	I	L	Q	P	D	P	P	A	N	I	T	V	T	A	230
724	CCC	CGC	TGG	CTC	AGT	GTC	ACC	TGG	CNA	GAC	CCC	CAC	TCC	TGG	AAC	TCA	783
231	P	R	W	L	S	V	T	W	Q	D	P	H	S	W	N	S	250
784	CTA	CGG	TTT	GAG	CTC	AGA	TAT	CGG	GCT	GAA	CGG	TCA	AAG	ACA	TTC	ACA	843
251	L	R	F	E	L	R	Y	R	A	E	R	S	K	T	F	T	270

Fortsetzung Fig. 2

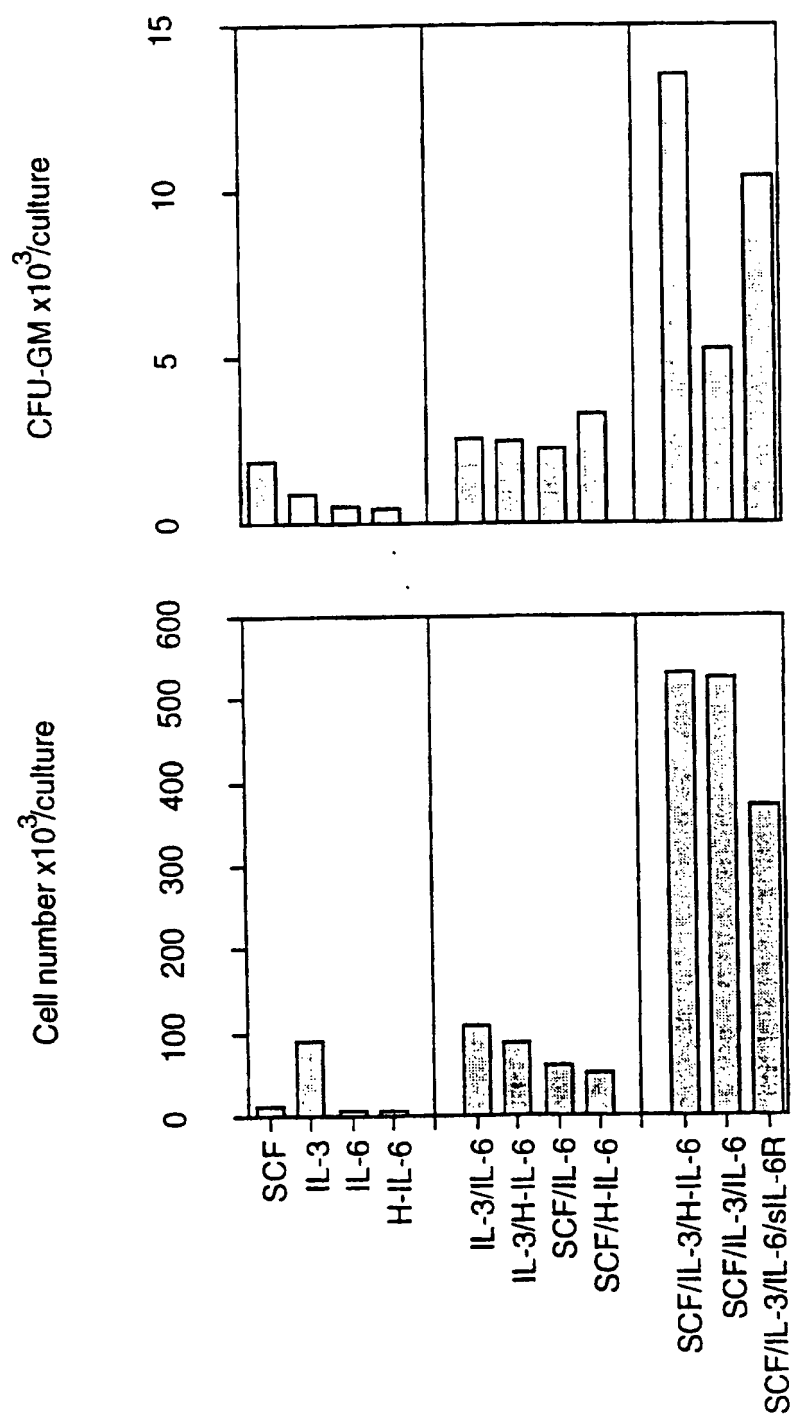
904 CAG CTT CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC GAG CCG GAG GCC 963  
 291 Q L R A Q E E F G Q G E W S E W S P E A 310  
 964 ATG GGC ACG CCT TGG ACA GAA TCC AGG AGT CCT CCA GCT CGA GGA GGT GGA GGT TCT GGA 1023  
 311 M G T P W T E S R S P P A R G G G G S G 330  
 1024 GGT GGA GGT TCT GTC GAG CCA GTA CCC CCA GAA GAT TCC AAA GAT GTA GCC GCC CCA 1083  
 331 G G G S V E P V P P P G E D S K D V A A P 350  
 1084 CAC AGA CAG CCA CTC ACC TCT TCA GAA CGA ATT GAC AAA CAA ATT CGG TAC ATC CTC GAC 1143  
 351 H R Q P L T S S E R I D K Q I R Y I L D 370  
 1144 GGC ATC TCA GCC CTG AGA AAG GAG ACA TGT AAC AAG AGT AAC ATG TGT GAA AGC AGC AAA 1203  
 371 G I S A L R K E T C N K S N M C E S S K 390  
 1204 GAG GCA CTG GCA GAA AAC AAC CTG AAC CTT CCA AAG ATG GCT GAA AAA GAT GGA TGC TTC 1263  
 391 E A L A E N N L N L P K M A E K D G C F 410  
 1264 CAA TCT GGA TTC AAT GAG GAG ACT TGC CTG GTG AAA ATC ATC ACT GGT CTT TTG GAG TTT 1323  
 411 Q S G F N E E T C L V K I I T G L L E F 430  
 1324 GAG GTA TAC CTA GAG TAC CTC CAG AAC AGA TTT GAG AGT AGT GAG GAA CAA GCC AGA GCT 1383  
 431 E V Y L E Y L Q N R F E S S E E Q A R A 450  
 1384 GTG CAG ATG AGT ACA AAA GTC CTG ATC CAG TTC CTG CAG AAA AAG GCA AAG AAT CTA GAT 1443  
 451 V Q M S T K V L I Q F L Q K K A K N L D 470  
 1444 GCA ATA ACC CCT GAC CCA ACC ACA AAT GCC AGC CTG CTG AAG AAG CTG CAG GCA CAG 1503  
 471 A I T P D P T T N A S L L T K L Q A Q 490  
 1504 AAC CAG TGG CTG CAG GAC ATG ACA ACT CAT CTC ATT CTG CGC AGC TTT AAG GAG TTC CTG 1563  
 491 N Q W L Q D M T T H L I L R S F K E F L 510  
 1564 CAG TCC AGC CTG AGG GCT CTT CGG CAA ATG TAG C ATG GGC ACC GTC GAC 1612  
 511 Q S S L R A L R Q M \* 520

082-280  
 27-1351  
 Resilienz

Fig. 3

Met	Asn	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	Ala	Phe	Gly	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Leu
Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Pro	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Pro	Pro
Gly	Glu	Asp	Ser	Lys	Asp	Val	Ala	Ala	Pro	His	Arg	Gln	Pro	Leu	Thr
5					10					15				20	
Ser	Ser	Glu	Arg	Ile	Asp	Lys	Gln	Ile	Arg	Tyr	Ile	Leu	Asp	Gly	Ile
				25					30					35	
Ser	Ala	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Cys	Asn	Lys	Ser	Asn	Met	Cys	Glu	Ser
			40					45					50		
Ser	Pro	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Met	Ala
		55					60					65			
Glu	Lys	Asp	Gly	Cys	Phe	Gln	Ser	Gly	Phe	Asn	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu
	70					75					80				
Val	Lys	Ile	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	Val	Tyr	Leu	Glu	Tyr
85					90					95				100	
Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	Val	Gln
				105					110					115	
Met	Ser	Thr	Lys	Val	Leu	Ile	Gln	Phe	Leu	Gln	Lys	Lys	Ala	Lys	Asn
			120					125					130		
Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu
		135					140					145			
Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Glu	Asp	Met	Pro	Thr	His
	150					155					160				
Leu	Ile	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Leu	Arg	Ala
165					170					175					180
Leu	Arg	Gln	Met												
			184												

Fig. 4



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/24, 15/12</b> <b>C07K 14/54, 14/715, 14/71, A61K 47/48, 38/17</b>		<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/32891</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 12. September 1997 (12.09.97)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE97/00458 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 7. März 1997 (07.03.97)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 08 813.5      7. März 1996 (07.03.96)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> ANGEWANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH [DE/DE]; Rischerstrasse 12, D-69123 Heidelberg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> ROSE-JOHN, Stefan [DE/DE]; I. Medizinische Klinik - Abt. Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Obere Zahlbacherstrasse 63, D-55101 Mainz (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger-Strasse 246, D-81825 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>  <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:</b> 5. Februar 1998 (05.02.98)	
<b>(54) Title:</b> CONJUGATE FOR MODIFYING INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS  <b>(54) Bezeichnung:</b> KONJUGAT ZUR BEEINFLUSSUNG VON WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PROTEINEN  <b>(57) Abstract</b>  The present invention concerns a conjugate comprising two polypeptides with a mutual affinity and connected via a linker. It also concerns the use of such a conjugate to modify interactions between proteins.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Konjugats zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen.			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/DE 97/00458

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/62 C07K19/00 C12N15/24 C12N15/12 C07K14/54  
 C07K14/715 C07K14/71 A61K47/48 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STOYAN T. ET AL.: "Recombinant soluble human interleukin-6 receptor" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 216, no. 1, 11 August 1993, pages 239-245, XP002047601	1-6,9
Y	see page 241, column 1, paragraph 4 ---	10-15
X	EHLERS M ET AL: "IDENTIFICATION OF TWO NOVEL REGIONS OF HUMAN IL-6 RESPONSIBLE FOR RECEPTOR BINDING AND SIGNAL TRANSDUCTION" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 153, no. 4, 15 August 1994, pages 1744-1753, XP000565715	1-6,9,15
Y	see page 1, column 2, paragraph 2 ---	10-14
	--- -/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 November 1997

Date of mailing of the international search report

15-12-1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/00458

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 04314 A (DADE INT INC ;WONG HING C (US); RHODE PETER R (US); WEIDANZ JON A) 15 February 1996	1-4,8-15
Y	see the whole document	1-7, 10-15
X	--- US 5 260 203 A (LADNER ROBERT C ET AL) 9 November 1993	1
Y	see the whole document	1-7, 10-15
X	--- WO 95 15341 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;CHESTER KERRY ANNE (GB); HAWKINS ROBERT) 8 June 1995	1
Y	see figures 1,11	1-7, 10-15
Y	--- SUI, X. ET AL.: "gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 92, March 1995, WASHINGTON US, pages 2859-2863, XP002047602 see the whole document	1-6, 10-15
P,X	--- FISCHER, M. ET AL.: "A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion" NATURE BIOTECHNOLOGY., vol. 15, no. 2, February 1997, PUBLISHING US, pages 142-145, XP002047603 see the whole document -----	1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DE97/00458

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
see supplementary sheet additional information PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**Note:**

Inasmuch the claim 15 refers to a treatment method to be applied to human / animal bodies, the research was made based on the quoted effects of the bond/compound

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/00458

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9604314 A	15-02-96	AU 3403995 A	04-03-96
		CA 2196085 A	15-02-96
		EP 0776339 A	04-06-97
-----			
US 5260203 A	09-11-93	US 4946778 A	07-08-90
		US 5455030 A	03-10-95
		US 5518889 A	21-05-96
		US 5534621 A	09-07-96
		JP 2000197 A	05-01-90
		DE 3785186 A	06-05-93
		DK 368588 A	01-07-88
		EP 0281604 A	14-09-88
		WO 8801649 A	10-03-88
-----			
WO 9515341 A	08-06-95	AU 1194795 A	19-06-95
		CA 2177584 A	08-06-95
		EP 0733072 A	25-09-96
		JP 9505737 T	10-06-97
		NZ 277057 A	27-07-97
-----			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: ales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00458

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/62 C07K19/00 C12N15/24 C12N15/12 C07K14/54  
C07K14/715 C07K14/71 A61K47/48 A61K38/17

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiert Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	STOYAN T. ET AL.: "Recombinant soluble human interleukin-6 receptor" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 216, Nr. 1, 11. August 1993, Seiten 239-245, XP002047601	1-6,9
Y	siehe Seite 241, Spalte 1, Absatz 4	10-15
X	EHlers M ET AL: "IDENTIFICATION OF TWO NOVEL REGIONS OF HUMAN IL-6 RESPONSIBLE FOR RECEPTOR BINDING AND SIGNAL TRANSDUCTION" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 153, Nr. 4, 15. August 1994, Seiten 1744-1753, XP000565715	1-6,9,15
Y	siehe Seite 1, Spalte 2, Absatz 2	10-14
	---	
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. November 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15-12-1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Chambonnet, F

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 97/00458

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 04314 A (DADE INT INC ;WONG HING C (US); RHODE PETER R (US); WEIDANZ JON A) 15.Februar 1996	1-4,8-15
Y	siehe das ganze Dokument	1-7, 10-15
	---	
X	US 5 260 203 A (LADNER ROBERT C ET AL) 9.November 1993	1
Y	siehe das ganze Dokument	1-7, 10-15
	---	
X	WO 95 15341 A (CANCER RES CAMPAIGN TECH ;CHESTER KERRY ANNE (GB); HAWKINS ROBERT) 8.Juni 1995	1
Y	siehe Abbildungen 1,11	1-7, 10-15
	---	
Y	SUI, X. ET AL.: "gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., Bd. 92, März 1995, WASHINGTON US, Seiten 2859-2863, XP002047602 siehe das ganze Dokument	1-6, 10-15
	---	
P,X	FISCHER, M. ET AL.: "A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion" NATURE BIOTECHNOLOGY., Bd. 15, Nr. 2, Februar 1997, PUBLISHING US, Seiten 142-145, XP002047603 siehe das ganze Dokument	1
	-----	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 97/00458

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung :

So weit der Anspruch 15

sich auf ein Verfahren zur

Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die

Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen

der Verbindung/Zusammensetzung.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung..., die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. des Abdruckzeichens

PCT/DE 97/00458

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9604314 A	15-02-96	AU 3403995 A CA 2196085 A EP 0776339 A	04-03-96 15-02-96 04-06-97
US 5260203 A	09-11-93	US 4946778 A US 5455030 A US 5518889 A US 5534621 A JP 2000197 A DE 3785186 A DK 368588 A EP 0281604 A WO 8801649 A	07-08-90 03-10-95 21-05-96 09-07-96 05-01-90 06-05-93 01-07-88 14-09-88 10-03-88
WO 9515341 A	08-06-95	AU 1194795 A CA 2177584 A EP 0733072 A JP 9505737 T NZ 277057 A	19-06-95 08-06-95 25-09-96 10-06-97 27-07-97



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :</b> <b>C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/24, 15/12</b> <b>C07K 14/54, 14/715, 14/71, A61K 47/48, 38/17</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/32891</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 12. September 1997 (12.09.97)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE97/00458  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 7. März 1997 (07.03.97)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 196 08 813.5      7. März 1996 (07.03.96)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> ANGE- WANDTE GENTECHNOLOGIE SYSTEME GMBH [DE/DE]; Rischerstrasse 12, D-69123 Heidelberg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> ROSE-JOHN, Stefan [DE/DE]; I. Medizinische Klinik - Abt. Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Obere Zahlbacherstrasse 63, D-55101 Mainz (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger- Strasse 246, D-81825 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Mit geänderten Ansprüchen und Erklärung.</i>  <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen-</b> <b>berichts:</b> 5. Februar 1998 (05.02.98)  <b>Veröffentlichungsdatum der geänderten Ansprüche und</b> <b>Erklärung:</b> 19. März 1998 (19.03.98)	
<b>(54) Title:</b> CONJUGATE FOR MODIFYING INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS  <b>(54) Bezeichnung:</b> KONJUGAT ZUR BEEINFLUSSUNG VON WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN PROTEINEN  <b>(57) Abstract</b>  The present invention concerns a conjugate comprising two polypeptides with a mutual affinity and connected via a linker. It also concerns the use of such a conjugate to modify interactions between proteins.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft ein Konjugat, das zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Konjugats zur Beeinflussung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen.		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

**GEÄNDERTE ANSPRÜCHE**

[beim Internationalen Büro am 12. Januar 1998 (12.01.98) eingegangen;  
ursprüngliche Ansprüche 1-15 durch geänderte Ansprüche 1-12 ersetzt (2 Seiten)]

1. Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende, Polypeptide, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke oder ein Polypeptid ist.
- 5 2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das eine Polypeptid ein Rezeptor und das andere ein den Rezeptor bindender Ligand ist.
3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor in  
10 Form seiner den Liganden bindenden Untereinheit vorliegt.
4. Konjugat nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand in Form seiner den Rezeptor bindenden Untereinheit vorliegt.
- 15 5. Konjugat nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ein Zytokin-Rezeptor und der Ligand ein Zytokin ist.
6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein IL-6 Rezeptor und das Zytokin ein IL-6 ist.
- 20 7. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zytokin-Rezeptor ein CNTF-Rezeptor und das Zytokin ein CNTF ist.
8. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß  
25 das Konjugat ein Fusionspolypeptid ist.

9. DNA, kodierend für das Konjugat nach Anspruch 8.

10. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 9.

5 11. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 10.

12. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1 - 8 und der DNA nach Anspruch 9 zur Beeinflussung der Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

10

**IN ARTIKEL 19 GENANNT ERKLÄRUNG**

I) Als Stand der Technik werden die folgenden Druckschriften genannt:

- (D1) Stoyan et al., European Journal of Biochemistry, Bd. 216, Nr. 1, S. 239-245 (1993)
- (D2) Ehlers et al., Journal of Immunology, Bd. 153, Nr. 4, S. 1744-1753 (1994)
- (D3) WO-A-96/04314
- (D4) US-A-5 260 203
- (D5) WO-95/15341
- (D6) Sui et al., Proceed. of the National Academy of Sciences USA, Bd. 92, S. 2859-2863 (1995)
- (D7) Fischer et al., Nature Biotechnology, Bd. 15, Nr. 2, S. 142-145 (Febr. 1997)

II) Der geänderte Anspruch 1 betrifft nun ein Konjugat, umfassend zwei, eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke oder ein Polypeptid ist.

III) Gegenüber dem im Recherchenbericht genannten Stand der Technik ist der Gegenstand der vorliegenden Anmeldung neu und erfinderisch. In keiner der zahlreichen Entgegenhaltungen D1-D6 ist ein Konjugat gezeigt oder nahegelegt, das zwei eine Affinität zueinander aufweisende Polypeptide umfaßt, wobei die Polypeptide über einen Linker miteinander verbunden sind und das dadurch gekennzeichnet ist, daß der Linker eine durch die zwei Polypeptide ausgebildete Disulfidbrücke oder ein Polypeptid ist. D7 stellt als P,X-Dokument keinen Stand der Technik dar, da von wirksamer Inanspruchnahme der Priorität ausgegangen wird.

This Page Blank (uspto)